

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**PROPAGACIÓN IN VITRO DE PIÑA (Ananas
comosus L. Merr.), UTILIZANDO
YEMAS AXILARES.**

T E S I S

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER :
HENRI DELGADO HAYA**

TARAPOTO-PERÚ
2004



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ÁREA DE MEJORAMIENTO GENETICO Y PROTECCIÓN DE
CULTIVOS

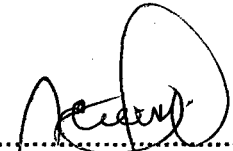
T E S I S

**“PROPAGACIÓN IN VITRO DE PIÑA (*Ananas*
comosus L. Merr.), UTILIZANDO**
YEMAS AXILARES”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER :
HENRI DELGADO HAYA

MIEMBROS DEL JURADO


.....
Ing. ARMANDO D. CUEVA BENAVIDES
Presidente


.....
Ing. SEGUNDO D. MALDONADO VÁSQUEZ
Miembro


.....
Ing. MARÍA E. RUIZ SANCHEZ
Miembro


.....
Dr. JORGE SANDOVAL ROJAS
Asesor

TARAPOTO-PERÚ
2005

DEDICATORIA

En memoria a Teresa por su sacrificio para sus hijos.

A mi padre, Alamiro.

A Julie, Karina, Tessy.

A Miguel y Alamiro 2º.

A E. Daniela y Pilar, por ser las que marcan mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Martín, por representar los anhelos de superación de nuestra juventud.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Convenio INA-UNSM, ámbito de formación de profesionales correctos, eficientes.

Al Biólogo MARCO ANTONIO LEON MARTINEZ, por su invalorable asesoramiento; maestro y amigo.

A mis colegas: Segundo Amasifuen, Tito Rojas, Obdulio Barrera, Francisco Arévalo, Luís Mendo, Roger Gálvez, Jim Vásquez..

INDICE GENERAL

	Pág.
I.- INTRODUCCION.	7
II.-OBJETIVOS	8
2.1.-OBJETIVO GENERAL	8
2.2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
III- REVISION DE LITERATURA	9
IV.- MATERIALES Y METODOS	25
4.1UBICACION DEL EXPERIMENTO	25
4.2 MATERIALES	25
MATERIALES DE CAMPO	25
MATERIAL FOTOGRAFICO	25
MATERIALES DE LABORATORIO	25
MATERIAL DE OFICINA	25
EQUIPOS	25
REACTIVOS	25
MATERIAL VEGETAL	25
4.3 METODOLOGIA	26
4.4 CONDICIONES DE CULTIVO	30
4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	32
ANALISIS DE VARIANZA	32
LOS TRATAMIENTOS	32
VARIABLES EVALUADAS	33
V.- RESULTADOS	34
VI.- DISCUCIÓN	41
VII.- CONCLUSIONES	44
VIII.- RECOMENDACIONES	47
IX.- RESUMEN	48
X.-SUMMARY	49
XI.-REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	50
ANEXO	55
ANEXO DE TERMINOS	56
ANEXO DE ABREVIATURAS	57
ANEXO FOTOGRAFIAS	60

I.- INTRODUCCIÓN.

Dentro de la familia de las Bromeliáceas el género *Ananas* es el de mayor importancia económica, en él se encuentran especies que le suministran al hombre el fruto de la piña, fibras y ornamento. La Piña (*Ananas comosus* L. Merr.) es uno de los frutales tropicales de mayor producción a nivel mundial (LEAL y ANTONI, 1978).

Es un cultivo que se propaga vegetativamente (propagación asexual) a partir de brotes, tipo de propagación que tiene la ventaja de proveer individuos con características idénticas al progenitor, pero tiene la desventaja de requerir gran cantidad de material vegetal para la instalación de un campo de cultivo, el material vegetal proviene de otros campos de cultivo, lo cual presenta un alto el riesgo de transmisión de problemas fitosanitarios.

La biotecnología, a través de la técnica del cultivo *in vitro* de plantas y específicamente de la micropropagación, permite la obtención de gran cantidad de material vegetal en un periodo de tiempo corto, en menor espacio, y de calidad genética y fitosanitaria garantizada.

El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo y adaptación de una tecnología de cultivo *in vitro* de piña, como una alternativa para la introducción de nuevas variedades y para “refrescar” el material actualmente en cultivo, incrementando su vigor y productividad.

II.-OBJETIVOS

2.1.-OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo de micro propagación de piña (*Ananas comosus*) a partir de yemas axilares.

2.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar un medio de cultivo para la diferenciación de yemas laterales provenientes de brotes, bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Determinar una concentración óptima de citoquinina (6-BAP), para la multiplicación de piña bajo condiciones *in vitro*.

Establecer un procedimiento para la aclimatación de plántulas de piña propagadas *in vitro*.

III- REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA.

INBIO (1997), menciona que la clasificación científica de la piña es:

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Bromeliales

Familia: Bromeliaceae

Género: Ananas

Especie: *Ananas comosus* (L.) Merr

3.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

BELLO (1991), reporta que la piña es una planta herbácea perenne que crece en generaciones sucesivas. Presenta un tallo corto de consistencia herbácea relativamente gruesa y entre nudos muy próximos.

Las hojas son erectas angostas y están adheridas al tallo formando un espiral compacto. Las hojas se clasifican en varios tipos, siendo la hoja "D" la de mayor importancia porque refleja el estado fisiológico de la planta en el periodo de su crecimiento y desarrollo y es útil para estimar las necesidades nutricionales de la planta. La hoja "D" se caracteriza por ser la hoja adulta mas joven que ha terminado su crecimiento, se diferencia de las otras hojas porque el borde del limbo en su base es perpendicular a la sección de la hoja

una vez separado de la planta o es ligeramente “divergente”. Presentan modificaciones especiales como son: los tejidos acuíferos que constituyen el depósito de agua de la planta y las tricomas que son excreciones de células muertas, en forma de sombrilla y que cubren completamente a la hoja.

A los tricomas se les atribuye varias funciones importantes como: la absorción de agua y soluciones nutritivas, reducen la pérdida de agua por la hoja al cubrir la hoja.

El sistema radical es pequeño, denso y presenta dos tipos de raíces: aéreas y subterráneas.

El pedúnculo es una prolongación del tallo que soporta al fruto.

La inflorescencia presenta flores de color violáceo después de la polinización estas se secan, continuando su desarrollo los órganos restante hasta formar el fruto múltiple y partenocárpico. Al final de su crecimiento presenta varios tipos de hijuelos que son: corona; hijuelos del pedúnculo, hijuelos del tallo, hijuelos de planta.

Cultivares

BELLO y OTINIANO (1994), mencionan que debido a su amplia distribución presenta muchos cultivares y selecciones. En la actualidad se han clasificado en cinco grupos: I Cayena, II Española; III Queen; IV Pernambuco; V Mordolina-Petrolera-Maupuri.

Siendo el cultivar más importante y sembrado en el mundo el denominado “Cayena Lisa”, cultivar sin espinas en las hojas, la cual puede desarrollarse en condiciones desfavorables tanto nutricionales como climáticas.

3.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA

COPPENS (1999), menciona que la piña es el fruto americano mas importante, y el tercero mas importante fruto tropical después de mango y el banano. Se cultiva en todos los países tropicales y subtropicales. La producción mundial anual se ha triplicado durante los últimos 30 años y ahora excede los 12 millones de toneladas. La mayor parte de su producción (70%) es consumida localmente como fruta fresca (Cuadro N° 01).

El comercio mundial de piña consiste en productos procesados, de los cuales el 80%, correspondiente a enlatados en rodajas (1,065,000 toneladas) y jugos (215,000 tonelada) el provisto por Tailandia y Filipinas. El mercado de fruta fresca (680,000 toneladas) esta dominado por Filipinas, Costa Rica, y Costa de Marfil, los cuales proveen del 60% del mercado europeo, el importador líder, con mas de 226,000 toneladas.

Cuadro N° 01: Producción de piña por país (En TM)

Países	Años					
	1998	1999	2000	2001	2002	%
Tailandia	2,087,707	1,986,700	2,083,390	1,787,442	2,353,037	15.27%
Brasil	1,371,340	1,622,770	1,806,837	1,640,900	1,717,700	12.10%
Filipinas	1,442,820	1,542,240	1,638,000	1,495,120	1,496,000	11.29%
India	1,060,000	1,100,000	1,100,000	1,100,000	1,100,000	8.10%
China	795,829	854,113	925,686	941,057	941,057	6.61%
Nigeria	800,000	800,000	830,000	857,000	881,000	6.18%
Colombia	387,000	329,300	330,000	360,000	407,753	2.69%
Costa Rica	260,000	260,000	355,000	400,000	400,000	2.48%
México	281,180	301,406	391,491	350,000	350,000	2.48%
Indonesia	703,300	501,111	385,770	326,950	326,950	3.33%
Estados Unidos	313,000	315,000	294,000	301,000	301,000	2.26%
Costa de Marfil	213,974	257,000	225,675	225,675	225,675	1.70%
Ecuador	79,947	123,597	199,899	195,122	198,255	1.18%
Otros	2,386,279	3,702,651	3,168,705	3,764,054	3,377,604	24.32%
Total Mundial	12,182,376	13,695,888	13,734,453	13,744,320	14,076,031	100.00%

Fuente: FAO (2004a)

Tailandia es el productor líder de piña (16% de la producción mundial), seguido por Brasil (13%) y Filipinas (13%), India (8.9%), y China (7.3%).

Importantes productores americanos son Colombia (329,300 toneladas), México (301,407 toneladas), Costa Rica (260,000), USA. (Hawai y Puerto Rico; 301,000 toneladas). Cerca del 70% de la producción mundial y el 96% de la piña utilizada por las industrias procesadoras proviene de un cultivar "Cayena Lisa". El cultivar "Queen" ha ocupado nichos pequeños y específicos de alta calidad y precio como fruta fresca. Recientemente, la industria de la

piña ha respondido al incremento de la demanda por fruta fresca de los mercados de zonas templadas, con la producción de cultivares mas atractivos como "MD2", también denominado "Golden Ripe". Los restos de la planta de piña y los desechos de su procesamiento en la forma de cáscara y corazón, y los sólidos centrifugados de la producción de jugos se usan como alimento animal.

La fibra de piña es considerada la mas delicada, en textura, que cualquier otra fibra vegetal. Con cerca de 60 cm.. de longitud, blanco, crema y lustroso como la seda, fácilmente acepta y retiene colorantes. Numerosas pruebas en Brasil, Florida, India y Filipinas han demostrado su excepcional resistencia a las sales, el vapor y la tracción. Una pequeña industria textil existe aun en Filipinas por la alta calidad de telas producidas con fibra de piña. La fibra de piña también ha sido procesada para producir papel muy delgado, con remarcable suavidad y capacidad de plegamiento.

3.4. INVESTIGACIÓN COLABORATIVA SOBRE LA PIÑA

La producción de piña de América del Sur, considerable y destinada a los mercados locales y nacionales principalmente, proviene de unas pocas variedades, generalmente robustas, pero muy susceptibles a los ataques de insectos, nematodos y hongos. Estas variedades constituyen un problema para los pequeños agricultores que deben enfrentar pérdidas sustanciales como las ocasionadas por la fusariosis en Brasil.

El CIRAD y el IPGRI han coordinado conjuntamente un proyecto financiado por la Unión Europea para recuperar y mejorar variedades de piña resistentes, que se puedan usar en sistemas de producción en pequeña escala, eleven el ingreso de los agricultores y produzcan mayor cantidad de fruta de alta calidad para el mercado regional. Participan en este proyecto instituciones como EMBRAPA (a través del CENARGEN y el CNPMF) en Brasil y el FONAIAP en Venezuela, países donde se encuentra la mayor diversidad de recursos genéticos de piña. Otros colaboradores en el proyecto son el CIRAD-FLHOR (Francia) y la Universidade do Algarve (Portugal).

El primer inventario de germoplasma de piña realizado por el proyecto permitió intercambiar y repatriar germoplasma perdido, incrementando algunas colecciones y salvaguardando accesiones raras. Este trabajo se complementó con una revisión de la lista de descriptores para el cultivo. Se desarrollaron marcadores moleculares para estudios de caracterización y mapeado genético. Los datos de caracterización han proporcionado información clave para determinar la diversidad genética de la piña y comprender su estructura. La información compilada en una base de datos promoverá el intercambio de información y germoplasma entre socios y curadores de colecciones de piña. El proyecto ha favorecido nuevos usos de variedades tradicionales y olvidadas para ampliar la base genética del cultivo de la piña. Más de 60 nuevas fuentes de resistencia a la fusariosis se han identificado. Los primeros resultados de hibridación indican que esta resistencia está controlada por un solo gen dominante, lo cual abre una gran probabilidad para mejorar cultivares resistentes que beneficiarán a los

cultivo a causa de esta enfermedad. Nuevos esquemas de mejoramiento que involucran la autofecundación y utilizan el mapeado de genes harán más eficiente la transferencia de resistencia a plagas y enfermedades entre las variedades, y promoverán un control integrado y ambientalmente amable de plagas y enfermedades.

El IPGRI ha contribuido significativamente al análisis y publicación de estudios de diversidad molecular, herencia de caracteres cualitativos, resistencia a fusariosis y premejoramiento de germoplasma. Tres revisiones sobre los recursos genéticos y el mejoramiento de la piña se han publicado. También se ha revisado la taxonomía de la piña en colaboración con el Jardín Botánico Marie Selby de los Estados Unidos. IPGRI (2004)

En el Perú, la zona de Chanchamayo y Satipo es importante dentro del contexto agrícola nacional, produce un total de 95 % de la piña del país (ARELLANO, 1987).

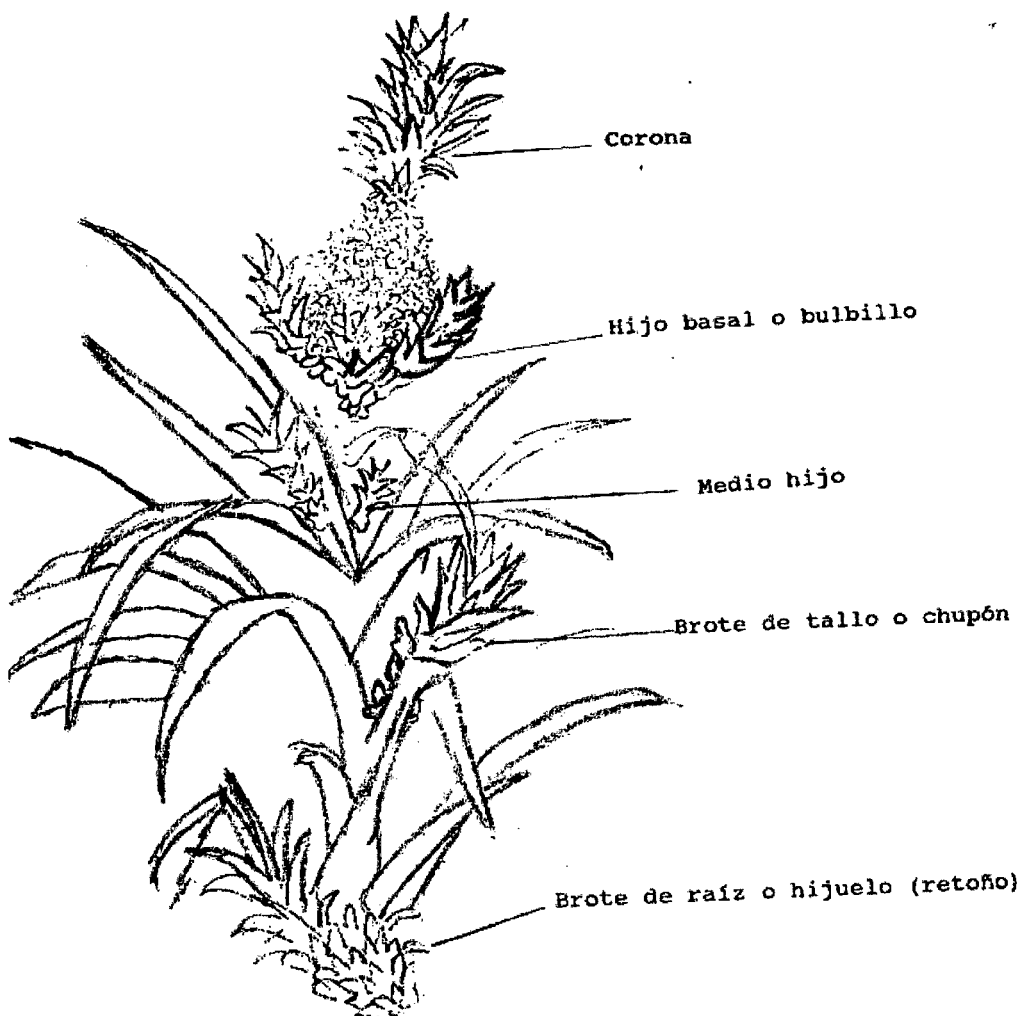
En la Región San Martín se sembraron 90.5 Has. Correspondientes a la campaña 2002/2003; con una producción de 204 TM en el mes de enero del 2003 (MINAG, 2003).

3.5. SELECCIÓN DE LA SEMILLA.

Hay tres tipos de semilla que son aceptables para la siembra comercial de piña, éstos son:

Corona (Crown). El pedúnculo corto con hojas verdes sobre el apex de la fruta, es la semilla preferida por su rápida y uniforme tasa de crecimiento, coronas pequeñas son susceptibles a enfermedades al momento de la siembra.

Figura N° 01. Tipos de semilla vegetativa obtenida de una planta adulta de piña.



Hijuelos (Slips). Ramas con muchas hojas provenientes de la base de la fruta o el pedúnculo de la fruta, tienen una rápida y uniforme tasa de crecimiento. Existe un defecto genético que se llama "cuello de hijuelos" que

debe ser evitado como fuente de semilla por su interferencia con el desarrollo de la fruta en la primera y segunda cosechas.

Brotes/retoños (Suckers). Ramas con muchas hojas provenientes de yemas axilares en el tronco de la planta, encima y debajo del suelo. Normalmente son más grandes en peso y largo, y más resistentes a enfermedades, su tasa de crecimiento es más lenta que las coronas e hijuelos y menos uniforme. Debido a su tamaño, comienzan a producir frutas en menos tiempo. Son recomendados donde hay presión de *Phytophthora* post siembra. FAO (2004b).

3.6. PLAGAS Y ENFERMEDADES

El marchitamiento originado por la cochinilla algodonosa es la enfermedad más ampliamente extendida en el cultivo de la piña y probablemente la más perjudicial, especialmente para el cultivar “Cayena Lisa”. Este cultivar es muy susceptible a este marchitamiento, pero existen algunos clones resistentes. “Red Spanish” y “Singapore Spanish” son usados en mejora genética debido a su resistencia. La causa real de esta enfermedad parece ser un virus, pero aún no ha podido ser probado.

La “mancha amarilla” si que se sabe que realmente es originada por un virus que es transmitido por un trips. La fuente de inóculo la constituye una adventicia de la familia de las compuestas denominada *Emilia sonchifolia*, de forma que la única medida de control práctica consiste en la erradicación de esta mala hierba.

3.7. CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS

ROCA Y MROGINSKI (1991), define el Cultivo de Tejidos como una técnica que consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido.

Al igual que otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre cultivada *in vitro*, son clones, es decir copias genéticamente iguales entre ellas e idénticas a la madre. En plantas propagadas por semilla la descendencia no es clonal, pues cada semilla tiene su propia base genética que resulta de genes de ambos progenitores (ROCA Y MROGINSKI, 1991).

Generalmente se emplean yemas y meristemas para regenerar nuevas plantas o estimular brotes múltiples, siendo muy importante mantener esta producción a perpetuidad (STYER, 1988; citado por RUÍZ 2003).

3.8. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados tienen diversas composiciones y se emplean como líquidos o geles (ROCA Y MROGINSKI, (1991). Los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta, macro y micronutrientes; un azúcar, vitaminas como la tiamina, glicina, entre otros; sustancias reguladoras del crecimiento; y otros compuestos.

Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales (HURTADO Y MERINO, 1988, citado por RUIZ, 2003).

3.9. VENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

MEJÍA (1988), indica las siguientes ventajas que ofrece la técnica:

Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material vegetal enfermo. Permite la propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo. Mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.

Permite mantener germoplasma en áreas relativamente pequeñas. Reduce costos de labores agronómicas en mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma en campo. Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año, mientras que por métodos convencionales, dependen de condiciones propicias. Facilita el intercambio de material genético e introducción cuarentenaria. Por medio de esta técnica es posible cultivar polen y anteras, mediante las cuales se producen plantas haploides. Cultivo y fusión de protoplastos para recombinar genes, para la obtención de nuevos genotipos. El cultivo de células en suspensión, facilitan la realización de trabajos para la obtención de plantas de constitución genética diferente.

Reduce el riesgo de pérdidas genéticas, al evitar la mezcla del material por cruzamiento.

3.10. DESVENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

MEJÍA (1988), describe las siguientes desventajas que ofrece la técnica:

Requiere de personal especializado como: Biólogos, Fisiólogos, Fitomejoradores o Fitopatólogos. Requiere de infraestructura y equipamiento especiales. La adquisición de productos es costosa y difícil especialmente para países en vías de desarrollo con pocos recursos económicos.

3.11. ACLIMATACIÓN

La anatomía de las plántulas *in vitro* difiere de las plantas cultivadas en el campo (DUSTAN, 1982; citado por RUIZ, 2003).

Las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen la cutícula escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90 a 100% que se da *in vitro*; como consecuencia cuando se transfiere la planta al suelo, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja; las hojas de una planta producida *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas, fotosintéticamente poco activas, sus células en empalizada son mas pequeñas y en menor cantidad, los estomas no son lo suficientemente operativo, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conducción vascular, las raíces que se han originado *in vitro* no tienen o tienen pocos pelos radicales, por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas (PIERIK, 1990).

3.12. FUNCIÓN DE LAS HORMONAS

TIZIO (1980), los ha clasificado en: 1) De correlación, como multiplicación y alargamiento celular, dominancia apical, actividad de las yemas, letargo, abscisión de órganos. 2) De sensibilidad o movimiento como los tropismos y nastias. 3) de reproducción como floración, polinización y desarrollo del fruto.

3.13. LAS AUXINAS

En interacción con otras hormonas, ejercen un efecto característico sobre la diferenciación celular, promoviendo la formación de órganos adventicios. Se dice además que promueven una diferenciación celular retornando las células a una fisiología de meristemas, tomando diversos caminos de diferenciación o formando masas de células indiferenciadas, verdaderos tumores que desorganizan la anatomía de los órganos.

3.14. LAS CITOCININAS

Son típicamente las hormonas de la división celular y activan el proceso directamente. Determinan la dominancia apical, promueve la formación de órganos, la germinación, activan el transporte de nutrientes.

Hay evidencia de que la aplicación de citocininas en diversas especies rompe la inhibición de yemas (AUNG Y BYRNE, 1978). Se ha demostrado también que las yemas *in vitro* no responden al tratamiento con BAP pero si lo hacen cuando se trata u segmento de tallo con una yema (PETERSON Y FLETCHER, 1975).

Manifiesta SUÁREZ (1990), que MORÁN (1981), trabajó con yemas de entrenudos en especies leñosas utilizando el medio básico de Murashige y Skoog (1962), con las variantes de sustancias de crecimiento que son Kinetina, BAP y Acido Giberélico obteniendo varias yemas a los 45 días de sembrados los explantes (RUÍZ, 2003).

3.15. PROPAGACIÓN CONVENCIONAL DE PIÑA (*Ananas comosus*).

GEORGE (1996) menciona que la planta de piña produce una fruta múltiple, formada por la reunión de muchos frutos individuales. Un alto número de cultivares de piña se cultivan a escala comercial para la producción de fruta fresca, jugos y fruta enlatada en diversos países de los trópicos y sub trópicos, incluidos, Australia, Hawai, Malasia y Sud África. Estos genotipos son propagados vegetativamente y pueden ser multiplicados en forma rápida y eficiente, logrando suficientes niveles de plantas establecidas.

La propagación convencional es usualmente emprendida por cultivo directamente en el suelo, utilizando solo las coronas, los retoños pequeños que aparecen en la base del fruto y otros en el tallo a nivel del suelo.

3.16. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PIÑA (*Ananas comosus*)

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado el cultivo *in vitro* de tejidos, órganos y células vegetales. La técnica de cultivo *in vitro* consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y fitohormonas (ROCA y MROGINSK, 1991).

MURASHIGE y SKOOG (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

Dentro de las principales aplicaciones del cultivo *in vitro*, la micro propagación es la técnica que ha logrado una rápida aceptación a escala industrial. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, ya que permite obtener un mayor número de plantas, así como tener un mayor control sanitario de las mismas. (ROCA y MROGINSKI 1991;; PIERIK, 1990; GEORGE, 1996).

STREETTM (1977) menciona que los beneficios potenciales del uso de cultivo de yemas apicales se han demostrado eficazmente en la conservación criogénica de germoplasma.

3.17. MICROPROPAGACIÓN DE PIÑA

Las técnicas de cultivo de los brotes son similares a los usados en las Bromeliáceas ornamentales. En el estado I la escisión de yemas de la corona, axilares o terminales, es generalmente cultivada en tubos de ensayo conteniendo agar-sólido con medio M&S o Linsmaier & Skoog (30 mg/l de sucrosa), aunque FITCHET (1990) y MURASHIGE & TUCKER (1969) usaron medio MS añadiendo auxinas y una cantidad mas alta de citoquininas para estimular el desarrollo de los brotes. El cultivo es incubado con luz artificial a 24-28°C. El desarrollo inicial de los explantes puede ser extremadamente

lento pudiendo ser necesaria la transferencia a un medio más fresco, aproximadamente a intervalos de seis semanas por muchos meses hasta obtenerse los retoños con hojas extendidas.

Los brotes pueden ser continuamente incubados en medio semisólido conteniendo, por ejemplo, 2 mg/l de 1-Ácido naftaleno acético (ANA), 2 mg/l de Ácido indol butírico (AIB), 2 mg/l de Kinetina (MATHEWS, 1976) y, para una rápida multiplicación, pueden ser puestos dentro de medio líquido, especialmente si son agitados a 100 r.p.m.

TAKASHI (1980), realizó propagación *in vitro* de bromelias, usando yemas laterales, en medio líquido suplementado con 1.0 mg/l de 6-Bencil Amino Purina (6-BAP), y 1.0 mg/l de ANA, obteniendo una proliferación óptima de las yemas adventicias. Subcultivadas en forma leves produjeron mucho más yemas adventicias de la parte basal. Los retoños obtenidos por este método fueron enraizados en medio sólido con 0.1 mg/l de ANA y sucesivamente establecidos en macetas.

ZEE, (1992), plantea todo un protocolo para la conservación *in vitro* de germoplasma de piña (*Ananas spp.*), con lo cual demuestra la importancia de la utilización del cultivo *in vitro*.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

Los experimentos se ejecutaron entre los meses de junio y diciembre del 2003; en los ambientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, situado en la Ciudad Universitaria, Morales.

4.2 MATERIALES

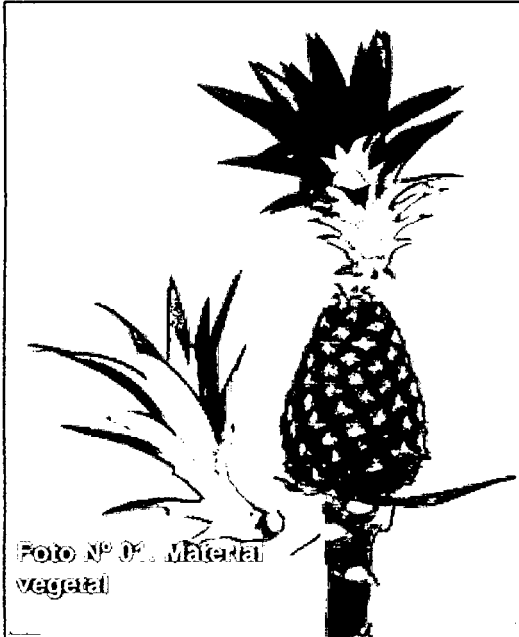
Cuadro N° 02. Materiales Utilizados durante la investigación.

MATERIAL VEGETAL	EQUIPOS	REACTIVOS
Hijuelos de la base de la infrutescencia.	Autoclave	1-Ácido naftale acético (ANA)
MATERIAL DE OFICINA	Balanza analítica	6-Bencil amino purina (6-BAP)
Papel bond A4	Refrigerador	Ácido Clorhídrico (HCl)
Lapiceros, regla, calculadora	Destilador	Hidróxido de potasio (KOH)
Tinta impresora Canon i250	Cámara de flujo laminar	Phytigel
MATERIAL FOTOGRÁFICO	Estereo microscopio	Buffer pH 7.00 y 4.00
Cámara fotográfica NIKON Digital	Estufa	Sales de M&S
	Potenciómetro	
MATERIALES DE LABORATORIO		
Pinzas largas de disección	Hojas de bisturís # 10 y 11, navajas, pinzas	
Matraces Erlenmeyer	Mecheros	
Picetas de 500 y 1000 ml.	Placas petri grandes de 20 mm por 150 mm.	
Pipetas graduadas de 1, 5, 10 ml.	Vasos de precipitados de 500 y 2000 ml.	
Probetas de 50, 500, 1000 ml.	Estuche de disección	
Cling Wrap	Detergente	
Algodón	Lejía comercial (NaOCl 5.25%)	

4.3. METODOLOGÍA

4.3.1. Preparación del material vegetal

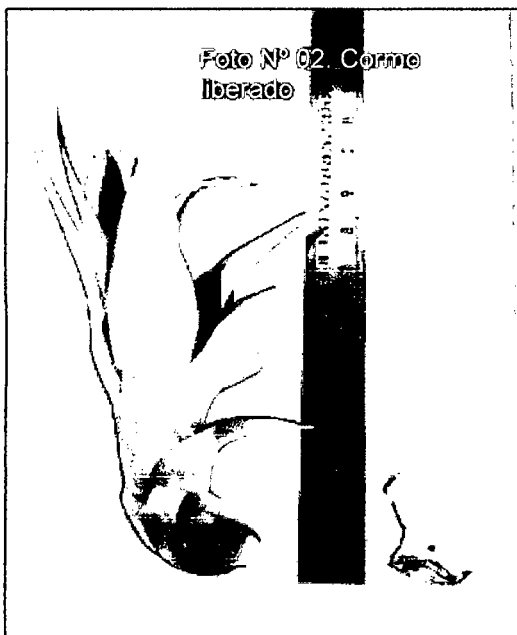
Se utilizaron brotes de la base del fruto, que presentaron buen grosor y desarrollo



vigoroso. En este cultivo los riesgos de contaminación son altos debido a la posición de las hojas y a la presencia de contaminantes sistémicos, las cuales envuelven al tallo y se encuentran a poca distancia del suelo. El material vegetal seleccionado fue lavado con abundante agua potable con la finalidad de eliminar restos de tierra. Se realizó un corte basal

para eliminar la zona de unión con la planta madre y otro corte apical

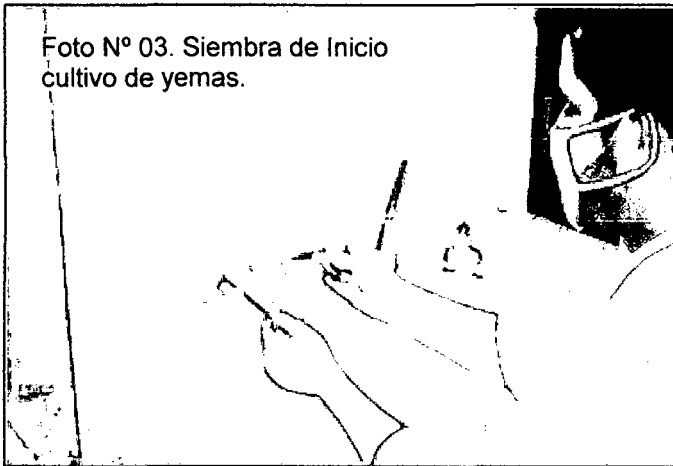
aproximadamente a 6 cm. de la base, volviéndose a lavar para luego eliminar 2 a 3 hojas de la zona basal. Posteriormente el material vegetal fue lavado con una solución de agua con detergente (5 g/l) en continua agitación durante 20 minutos, después se enjugaron los explantes con abundante agua de caño con la finalidad de eliminar restos del detergente; procediéndose luego a desinfectar los



explantes.

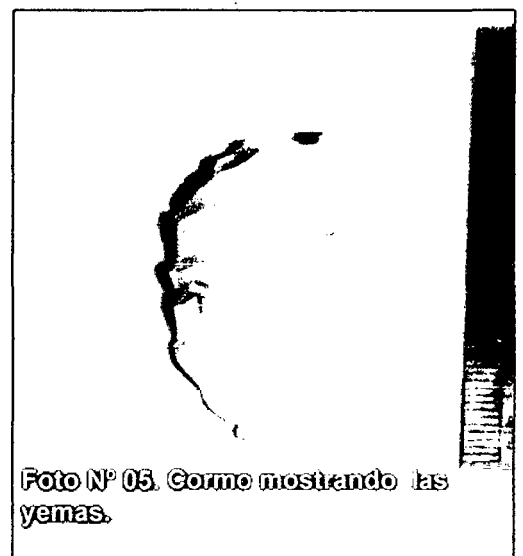
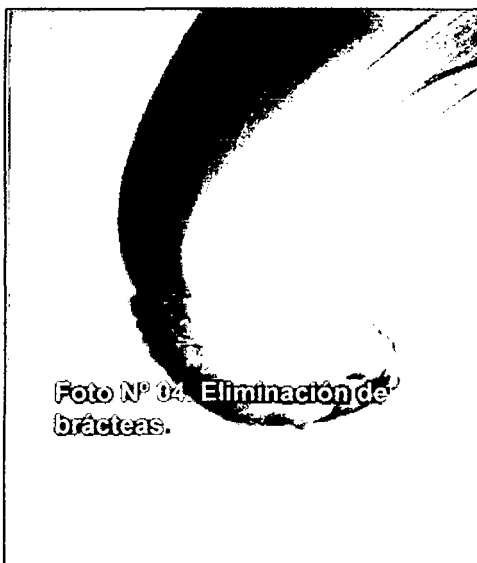
4.3.2. Desinfección de los explantes

Se realizó una primera desinfección sumergiendo los explantes en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% durante 10 minutos, trasladándose luego a la cámara de flujo laminar, donde bajo condiciones de



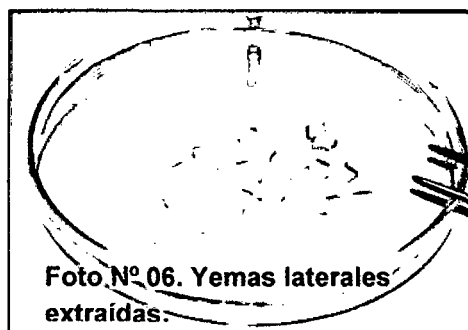
flujo de aire estéril, se procedió a eliminar las hojas basales restantes con una pinza esterilizada, hasta exponer las yemas laterales. Se procedió entonces a tratarlas con una solución desinfectante de

hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,25% durante 5 minutos en continua agitación, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril con el fin de eliminar totalmente residuos de la solución desinfectante procediéndose luego a la extracción y siembra de la yema lateral.



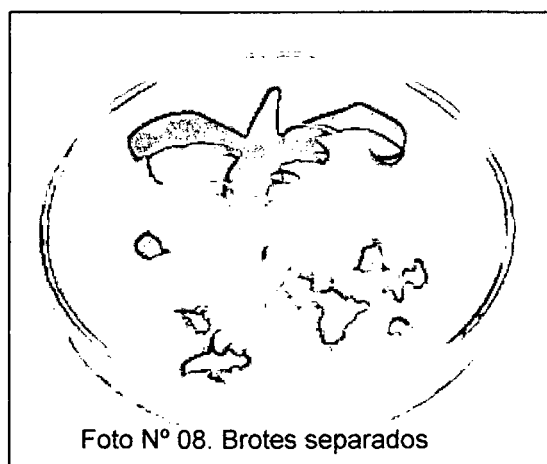
4.3.3. Extracción e introducción de yemas laterales a condiciones *in vitro*

Extraída la yema lateral con una hoja de bisturí N° 11 se procedió a introducir el explante a condiciones *in vitro*, para lo cual se utilizaron frascos de 15 onzas de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo de inducción.



4.3.4. Proliferación de brotes

Las yemas diferenciadas fueron sub cultivadas en un medio de cultivo conteniendo: sales de M&S (1962) a concentración total, suplementado con 6-BAP a concentraciones de 0.5 , 1.0 y 1.5 mg/l, sacarosa 30 g/l, Gel Rite 2.5 g/l, con un pH = 5.6.



4.3.5. Enraizamiento

Los brotes obtenidos fueron transferidos a un medio de cultivo M&S (1962) a mitad de concentración, en el cual enraizaron satisfactoriamente.

4.3.6. Aclimatación de plántulas

Una vez obtenido buen desarrollo radicular y un tamaño de 3 cm. de altura, las plántulas se aclimataron en sustrato natural (tierra negra) esterilizado en autoclave a 15 lbs por 20 minutos.



Foto N° 09. Inicio aclimatación

4.4 CONDICIONES DE CULTIVO

4.4.1 Medios de Cultivo

Para la introducción y el establecimiento de los explantes los medios de cultivo evaluados fueron los siguientes:

Cuadro N° 03 Composición De Medios De Cultivo Empleados Para La Diferenciación De Yemas Laterales

CONSTITUYENTES	Medio LCTV *	Medio M & S *	Medio ZEE *
SALES (Macro- y Micro- Nutrientes)	mg./l.	mg./l.	mg./l.
Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000	1650.000	1650.000
Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000	1900.000	1900.000
Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000	440.000	440.000
Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000	370.000	370.000
Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000	170.000	170.000
Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000	16.000	16.000
Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	8.600	8.600
Acido Bórico H_3BO_3	6.200	6.200	6.200
Ioduro de Potasio KI	0.830	0.830	0.830
Ac. Molibdico $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	0.250	0.250
Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
HIERRO:			
Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800	27.800	27.800
Agente quelante Na_2 -EDTA	37.300	37.300	37.300
VITAMINAS:			
Tiamina-HCl	0.400	0.400	0.400
Acido nicotínico			
Adenina hemisulfato			40.00
SUSTANCIAS ORGANICAS COMPLEJAS			
Sucrosa	30.0 g	30.0 g	30.0 g
Agua de Coco			250 ml
HORMONAS:			
6-BAP	2.00		
ANA	2.00		
pH	5.70	5.80	5.80

* En los tres medios de cultivo, se tomó como base al Medio de Cultivo M&S (1962), a concentración total; en los tres casos se utilizaron medios de consistencia líquida.

Cuadro N° 04 Composición Del Medio De Cultivo Utilizado Para La Prueba De Multiplicación De Brotes Laterales

CONSTITUYENTES	TI	TII	TIII
SALES (Macro- y Micro- Nutrientes)	mg./l.	mg./l.	mg./l.
Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000	1650.000	1650.000
Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000	1900.000	1900.000
Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000	440.000	440.000
Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000	370.000	370.000
Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000	170.000	170.000
Sulfato de Manganeseo $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000	16.000	16.000
Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	8.600	8.600
Acido Bórico H_3BO_3	6.200	6.200	6.200
Ioduro de Potasio KI	0.830	0.830	0.830
Ac. Molibdico $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	0.250	0.250
Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
HIERRO:			
Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800	27.800	27.800
Agente quelante Na_2 -EDTA	37.300	37.300	37.300
VITAMINAS:			
Tiamina-HCl	0.400	0.400	0.400
Acido nicotínico			
SUSTANCIAS ORGÁNICAS COMPLEJAS			
Sucrosa	30.0 g	30.0 g	30.0 g
HORMONAS:			
6-BAP	0.50	1.00	1.50
pH	5.70	5.70	5.70

4.4.2 Condiciones del Cultivo

Los explantes fueron mantenidos en el ambiente de incubación bajo las siguientes condiciones de cultivo:

- ♦ **LUZ.**- Los explantes y plántulas bajo una intensidad luminosa calculada de 2,000 lux. Proporcionada por fluorescentes de 40 Watts.
- ♦ **FOTOPERIODO.**- 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad. Controlado por un Reloj Horario automático.
- ♦ **TEMPERATURA.**- $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Controladas con equipos de aire acondicionado.

4.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizo un Diseño Completamente al Azar con tres tratamientos y diez repeticiones por tratamiento.

$$\text{Modelo aditivo lineal: } Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

La unidad experimental estará constituida por 01 frasco conteniendo el medio de cultivo respectivo + un explante (yema lateral).

4.5.1. ANÁLISIS DE VARIANZA

Cuadro N° 05. Esquema del Análisis de Varianza.

FUENTE DE VARIABILIDAD	GRADO DE LIBERTAD
Tratamientos	$t - 1 = 2$
Error	$t (r-1) = 27$
TOTAL	$(r.t - 1) = 29$

4.5.2. TRATAMIENTOS

Cuadro N° 06 Composición de los tratamientos.

Tratamientos/Pruebas	TI	TII	TIII
PRUEBA DE DIFERENCIACIÓN DE YEMAS	Medio Zee	Medio M&S	Medio LCTV
PRUEBA DE MULTIPLICACIÓN DE BROTES	Medio M&S + 0.5 mg/l de 6-BAP	Medio M&S + 1.0 mg/l de 6-BAP	Medio M&S + 1.5 mg/l de 6-BAP

Los detalles de la composición de los medios ZEE, M&S y LCTV se indican en el cuadro N° 02

Se consideró 10 repeticiones por cada tratamiento.

4.5.3. VARIABLES EVALUADAS

Porcentaje de Contaminación

Se evaluó el porcentaje de contaminación, obtenido en cada tratamiento.

Diferenciación del explante

Se evaluó el medio más adecuado para la diferenciación de yemas laterales provenientes de brotes de la base del fruto. Se consideró yema inducida a aquella que manifiesta el desarrollo de una bráctea (hoja).

Número de plántulas por yema diferenciada y por concentración de 6-BAP.

Se determinó el número de plántulas obtenidas por plántula, luego de un sub cultivo en medio de multiplicación.

Aclimatación

Se evaluó el porcentaje de plántulas aclimatadas y el sustrato utilizado así como el tiempo empleado para esta fase de cultivo.

V.- RESULTADOS

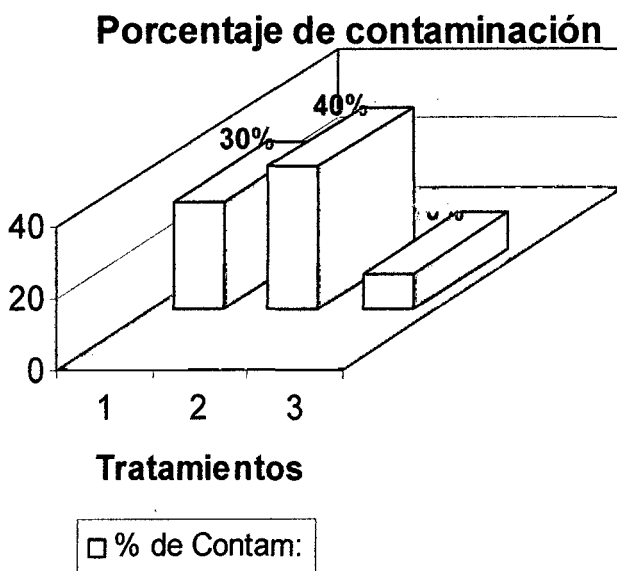
5.1 Evaluación del porcentaje de contaminación de yemas laterales introducidas para diferenciación.

Cuadro N° 07: Porcentaje de contaminación por tratamientos

Repetición	Contaminación		
	Tto I	Tto II	Tto III
1	SI	NO	NO
2	NO	SI	SI
3	NO	NO	NO
4	SI	SI	NO
5	NO	NO	NO
6	NO	NO	NO
7	NO	NO	NO
8	NO	SI	NO
9	NO	NO	NO
10	SI	SI	NO
% de Contam:	30%	40%	10%
% Promedio	26.67		

SI = Contaminado NO=No contaminado

Grafico N° 01 Porcentaje de contaminación en los tratamientos



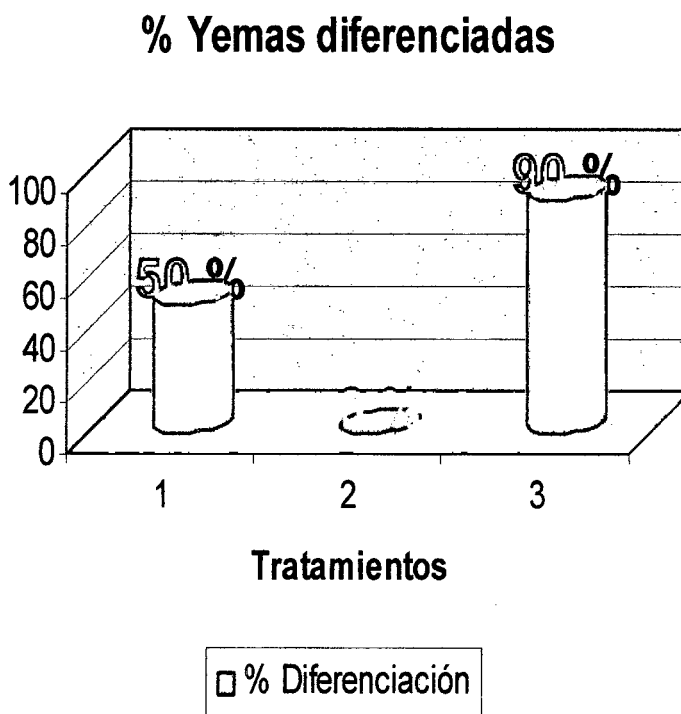


5.2. Diferenciación de yemas.

Cuadro N° 08: Número de yemas inducidas por medio de cultivo evaluado en 10 observaciones por tratamiento.

Total	Tto I	Tto II	Tto III
	Medio ZEE	Medio M&S	Medio LCTV
	5	0	9
% Diferenciación	50	0	90

Grafico N° 02 Porcentaje de diferenciación de yemas por tratamiento en estudio.

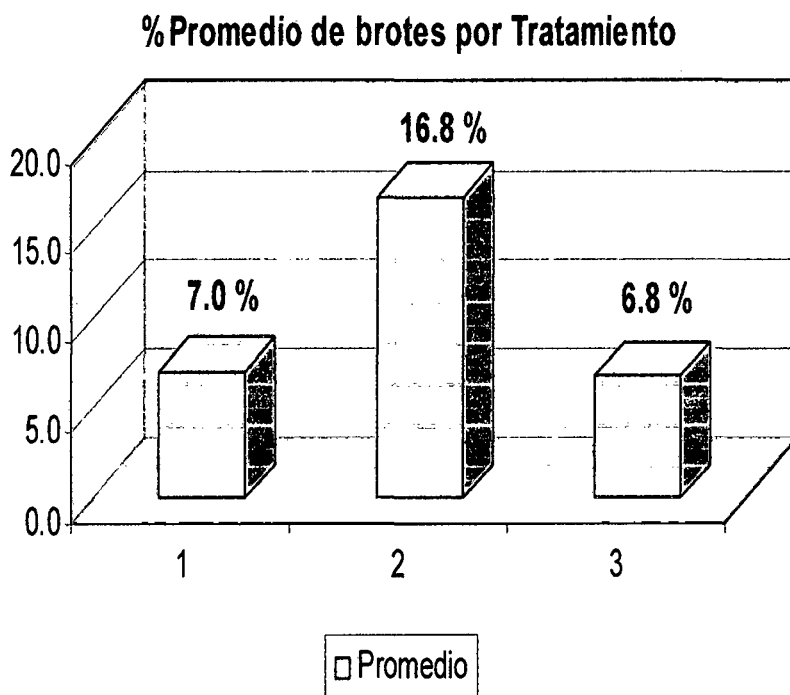


5.3 Número de brotes por tratamiento

Cuadro N° 09 : Número de brotes por concentración de 6-BAP en medio de cultivo M&S.

Repetición	Concentración de BAP (mg/l)		
	TI (0.5)	TII (1.0)	TIII (1.5)
1	9	22	7
2	6	16	5
3	7	14	8
4	7	17	8
5	9	13	7
6	4	17	6
7	6	18	9
8	6	16	5
9	7	16	6
10	9	19	7
Promedio	7.0	16.8	6.8

Grafico N° 03 Promedio de brotes por tratamiento



Cuadro N° 10 Analisis de Varianza para el número de brotes en los tratamientos estudiados.						
F.Variación	G.L	S.C	C.M	F.Calc	F. Tabula	Signific.
TRATAMIENTOS	2	653.5998	326.7999	90.7776	3.35 - 3.49	**
ERROR	27	97.2002	3.6			
TOTAL	29	750.8	330.3999			

$$\bar{X} = 10.2$$

$$C.V = 18.6 \%$$

$$R^2 = 87.1 \%$$

Tratamientos :

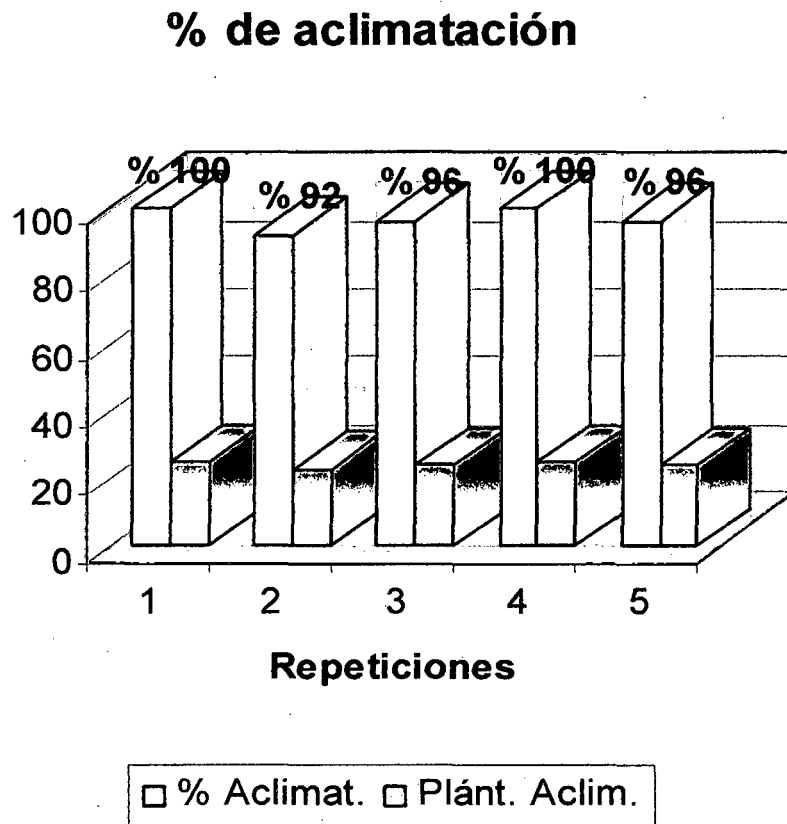
T _I :	0.5 mg/l de 6-BAP; Y ₁ = 7.00	(b)	*
T _{II} :	1.0 mg/l de 6-BAP; Y ₂ = 16.80	(a)	**
T _{III} :	1.5 mg/l de 6-BAP; Y ₂ = 6.80	(b)	*

5.4. Porcentaje de plántulas aclimatadas

Se realizó la aclimatación de plántulas de acuerdo al Protocolo y a la metodología descrita, los resultados fueron los siguientes a 20 días de iniciada la misma.

Cuadro N° 11 PORCENTAJE DE PLANTULAS ACLIMATADAS					
	ENVASE 1	ENVASE 2	ENVASE 3	ENVASE 4	ENVASE 5
Plánt. Semb.	25	25	25	25	25
Plánt. Aclim.	25	23	24	25	24
% Aclimat.	100	92	96	100	96
% Promedio	96.8				

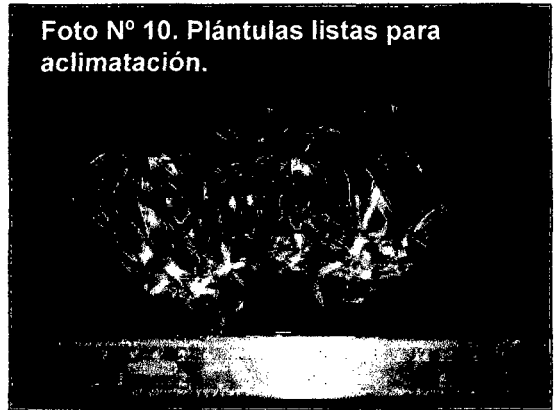
Grafico N° 04 Porcentaje de aclimatación de plántulas de piña a 20 días.



5.5. Protocolo de aclimatación de plántulas de piña propagadas *in vitro*

Material vegetal

Plántulas pequeñas de 3 cm. de longitud son trasladadas al ambiente de aclimatación, en la cual se separan del frasco *in vitro*, para ser lavadas con la finalidad de eliminar restos de medio de cultivo de las raíces.



Este lavado debe realizarse con mucho cuidado, ya que de no eliminarse estos restos se pueden perder las plántulas por contaminación.

Tratamiento previo a la siembra

A estas plántulas les son recortadas las raíces y hojas bajas con la finalidad de facilitar la manipulación de las mismas durante el proceso de aclimatación.

Estas plántulas son sumergidas en una solución de enraizador durante 5 minutos como mínimo; este tratamiento asegurará la desinfección de la plántula así como el enraizamiento de la misma durante su aclimatación.

Sustrato

El sustrato utilizado estuvo compuesto por una proporción de dos partes de tierra negra, mas una parte de arena lavada y una parte de humus de lombriz; las cuales bien mezcladas fueron desinfectadas al vapor, por 15 lbs. durante 20 minutos en olla autoclave.

Recipientes utilizados

Se utilizó botellas descartables de gaseosa, las cuales fueron cortadas a una

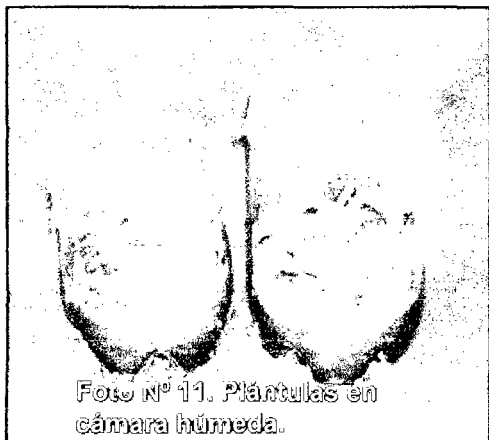


Foto N° 11. Plántulas en cámara húmeda.

altura de 20 cm. Y también se les practicó agujeros en la parte basal para facilitar el drenaje del sustrato. En este recipiente se colocó 5 cm. en altura de sustrato estéril, para luego plantar unas 5 plántulas tratadas por recipiente, teniendo cuidado de que las plántulas queden fijas al

sustrato; luego de este paso se procedió a tapar la boca del recipiente con una sección de plástico (crear efecto de cámara húmeda), la cual era sujeta con hilo pabilo, esto último para evitar la deshidratación de las plántulas (ver foto N° 08).

De acuerdo a las observaciones realizadas, son necesarias un mínimo de 20 días en cámara húmeda para luego trasplantarlas a bolsas conteniendo sustrato, luego del cual pueden ser llevadas a un vivero en el cual permanecerán un tiempo de 30 días como mínimo, con la finalidad de lograr crecimiento en altura de la planta.

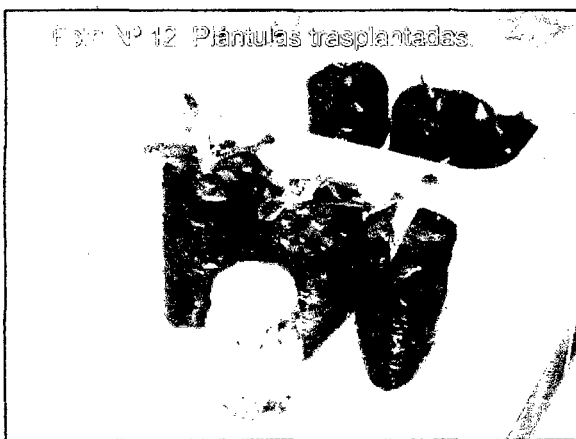


Foto N° 12 Plántulas trasplantadas.



Foto N° 13. Planta en vivero.

VI.- DISCUSIÓN

6.1. Porcentaje de Contaminación

Aun cuando las publicaciones sobre cultivo in vitro de piña (ZEE, 1992; TAKASHI, 1980; GEORGE, 1996) no reportan problemas de contaminación en sus experimentos, los ensayos preliminares de introducción in vitro reportaron porcentajes entre 90 % y 100% para el cultivo de yemas laterales de *Ananas comosus* L. Merr. ello probablemente se debió a la presencia de contaminantes endógenos (bacterias y levaduras) que no pudieron ser eliminados con los procedimientos de esterilización superficial utilizados. Por esta razón se decidió realizar ensayos con brotes en activo crecimiento, tal como se observa en la Foto N° 02, con lo cual el porcentaje promedio de contaminación fue de 26,67% (ver cuadro N° 07).

Pudimos observar que la selección de material vegetal sano y de parcelas de agricultores que realicen control fitosanitario, muestran menor incidencia de contaminación in vitro.

6.2. Diferenciación del explante

Según el cuadro N° 08, solo se obtuvo diferenciación de yemas laterales en los tratamientos TI y TIII, constituyendo el tratamiento mas apropiado para la diferenciación de yemas laterales de *Ananas comosus* L. Merr., el tratamiento TIII denominado LCTV, en el cual se obtuvo un 90% de diferenciación, seguido por el tratamiento TI con 50 % de diferenciación, lo cual reafirma lo mencionado por AUNG y BYRNE en 1978 respecto a que la aplicación de

citocininas en diversas especies rompe la inhibición de yemas; además PETERSON y FLETCHER, en 1975, reportan que esta demostrado también que las yemas *in vitro* no responden al tratamiento con 6-BAP pero si lo hacen cuando se trata un segmento de tallo con una yema, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que en este estudio se utilizaron yemas laterales con una pequeña sección de tallo.

Además, es importante la adición de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo desarrollados para la diferenciación de órganos, ya que las concentraciones de éstas a nivel de órganos sujetos a dominancia apical son bajas; por lo tanto su adición promueve la multiplicación y división celular, tal y como lo menciona MATHEWS (1976) al reportar que los brotes pueden ser continuamente incubados en medio semisólido conteniendo, ANA, AIB. Nuestros resultados muestran que, para una rápida multiplicación, no es necesario el empleo de medio líquido en agitación (100 rpm), siendo suficiente el cultivo en medio líquido sin agitación, suplementado con 1.0mg/l de 6-BAP.

6.3. Número de plántulas por yema diferenciada y por concentración de 6-BAP.

El análisis de varianza para el numero de brotes por concentración de 6-BAP a los 60 días de subcultivo, nos dio como resultado un coeficiente de variabilidad de 18,6% que esta dentro del rango de dispersión aceptable para trabajos agronómicos según CALZADA (1970), su coeficiente de determinación fue de 87,1%, lo cual muestra la eficiencia en la conducción del trabajo de investigación. Según el cuadro N° 11 existió diferencia altamente significativa

entre las concentraciones de 6-BAP. Esto explica la influencia de las citocininas en la multiplicación celular.

En el cuadro N° 11, la prueba de Duncan para las tres concentraciones de 6-BAP, ha dado como resultado, que el TI y TIII no muestran diferencias significativas entre si, diferenciándose del TII, lo cual muestra la relación con los contenidos hormonales propuestos por TAKASHI (1980), el cual propagó bromelias a partir de yemas axilares.

6.4. Aclimatación

En el cuadro N° 11 se observa que el porcentaje promedio de aclimatación fue de 96,8%, lo cual constituye un porcentaje elevado. Durante este proceso las plántulas deben desarrollar un conjunto de adaptaciones anatómicas y fisiológicas como la capacidad para responder a una baja humedad ambiental mediante el oportuno cierre de sus estomas, el incremento de la epicutícula cerosa protectora, así como una más intensa actividad fotosintética y una eficiente absorción radicular de los nutrientes (FUCHIGAMI et. al.1981).

VII.- CONCLUSIONES

6.1. Contaminación

La combinación de una primera desinfección a una concentración de 2% y una segunda a 0.5% de hipoclorito de sodio, dio buenos resultados, los cuales incluso podrían ser mejorados con una mayor exposición de las yemas ya extraídas del brote antes de ser cultivadas *in vitro*.

Es muy importante la elección apropiada de las plantas donadoras de yemas ya que en ella se deben considerar criterios como, control químico previo, edad de la planta donadora, estado sanitario, entre otros.

Todos los casos de contaminación observada ocasionaron turbidez en el medio de cultivo, sin interferir significativamente con el desarrollo del explante.

6.2. Diferenciación

El tratamiento mas apropiado para la diferenciación de yemas laterales de *Ananas comosus* L. Merr., fue el tratamiento TIII denominado LCTV, en el cual se obtuvo un 90% de diferenciación de yemas estudiadas.

El medio LCTV, a diferencia de los demás medios estudiados esta compuesto por 2 mg/l de 6-BAP y 2 mg/l de ANA; lo cual muestra la importancia de la éstos compuestos en la diferenciación de órganos y tejidos vegetales, ya que en las yemas de brote, aun no se desarrolla esta capacidad de diferenciación por haber estado sujetos al efecto de dominancia apical.

El medio ZEE estuvo suplementado con Adenina hemisulfato (40 mg/l), en este medio de cultivo se obtuvo un 50% de diferenciación de yemas laterales

El medio M&S solo estuvo constituido por sales macro y micro concentración total, en este medio de cultivo no se obtuvo diferenciación alguna de yemas laterales.

6.3. Proliferación de brotes

Los tres tratamientos en estudio mostraron la facultad de inducir la aparición de brotes, tal y como se observa en el cuadro N° 08 en el cual se observan los promedios de brotes por tratamiento.

El tratamiento T1 (1.0 mg/l de 6-BAP), muestra la mas alta tasa de proliferación promedio, con 16.8 brotes luego de 60 días de cultivo. Considerando este resultado, en teoría se podría obtener 22,483,074 en un año, a partir de una sola plántula.

6.4. Aclimatación

El sustrato utilizado, tuvo un comportamiento adecuado en cuanto a su capacidad de retener agua, elemento importante durante el proceso de aclimatación, ya este acondicionó el recipiente de aclimatación creando el efecto de una cámara húmeda.

No se observaron signos de marchites durante los primeros días de aclimatación, como es usual observar en otras especies; esto nos indica la rusticidad de *Ananas comosus* L. Merr. al proceso de aclimatación.

Las plántulas de *Ananas comosus* L. Merr. en aclimatación presentan hojas (brácteas) alargadas, debido a la densidad, intensidad luminosa a la que se encuentran sujetas; esta característica cambia en plántulas cultivadas en vivero, en las cuales ya se observan las características propias de *Ananas comosus* L. Merr.

VIII.- RECOMENDACIONES

Se recomienda:

Separar gradualmente los brotes que van apareciendo en la base de la plántula *in vitro*, para evitar competencia entre ellas, lograr mayor tamaño de brotes y alcanzar mayores tasas multiplicación; además es necesario subcultivar brotes para evaluar la capacidad de emitir brotes luego de varios subcultivos.

Utilizar esta metodología de propagación masiva de plántulas de *Ananas comosus* L. Merr. con fines de introducción de nuevas variedades libres de enfermedades y mejoramiento genético.

Probar la eficiencia de la agitación rotatoria en la multiplicación de esta especie a partir de yemas y meristemas.

Realizar estudios microeconómicos y evaluaciones del comportamiento agronómico de plántulas de *Ananas comosus* L. Merr. propagadas *in vitro*, con la finalidad de validar la información de literatura la cual menciona que las cualidades agronómicas de un cultivo se ven incrementadas luego de un proceso de cultivo *in vitro*.

Las técnicas desarrolladas en el presente trabajo, deberían aplicarse a la producción masiva de plántulas y el “refrescamiento” las variedades cultivadas en la Región San Martín.

IX.- RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos: Desarrollar un medio de cultivo para la diferenciación bajo condiciones de cultivo *in vitro* de yemas laterales provenientes de brotes. Estandarizar una concentración de 6-BAP, para la multiplicación de piña bajo condiciones *in vitro*. Establecer un procedimiento para la aclimatación de plántulas de piña propagadas *in vitro*.

El medio de cultivo para la diferenciación fue determinado evaluando el comportamiento de yemas laterales de *Ananas comosus* L. Merr. en tres tratamientos cuyo medio básico fue el de Murashige y Skoog (MS), las yemas que mejor respuesta tuvieron a la diferenciación fueron cultivadas en el medio conteniendo sales M&S a concentración total + Sucrosa 30 g/L + 6-BAP 2mg/l + ANA 2mg/l y pH= 5.7.

La concentración optima de 6-BAP, para la multiplicación de plántulas fue la de 1.0 mg/l, en medio de cultivo MS.

Se ha desarrollado un procedimiento eficiente para la propagación y aclimatación de plántulas de *Ananas comosus* L. Merr. enraizadas *in vitro*, posibilitando la aplicación de ésta técnica a la producción masiva de nuevos cultivares o el “refrescamiento” de los ya existentes en la Región San Martín.

X.- SUMMARY

Our research had the following objectives: Developing a plant tissue culture media for in vitro differentiation of lateral buds in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) obtained from field grown suckers, standardizing a optimal concentration of Benzil-amino-purine (6-BAP) for in vitro shoot multiplication of pineapple and establishing a procedure for acclimatizing pineapple plantlets obtained *in vitro*.

The culture media for differentiation was established after evaluation of lateral bud development using three treatments with Murashige & Skoog (1962) basal salts full strength. The best response differentiating lateral buds was obtained in a medium supplemented with Sucrose (30 g/l), 6-BAP (2mg/l) + Naftalene-acetic acid (ANA) 2mg/l and pH= 5.7.

Our results suggest that optimal concentration for 6-BAP for shoot multiplication was 1.0 mg/l in a M&S basal SALT culture medium.

We have developed an efficient procedure for in vitro propagating and acclimatizing previously rooted pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) plantlets. It will let us apply these techniques to mass propagation of new cultivars o “refreshing” the already used in San Martín.

X.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARELLANO, C. 1987. "El barrenador del fruto del palto" *Stenoma catenifer* Walsh y su control natural en Chanchamayo y Satipo.
Fuente: SICA. IBRAF/DATAFRUTA/Enero 1994.
2. AUNG, L. H. y J. M. BYRNE 1978. Plant Physiol. 62: 276-279.
3. BELLO A, S. 1991. "Cultivo de la Piña en la Selva Central del Perú".
Serie Informe Técnico 02.12.03 N° 150 Edit. Misión Agrícola.
Lima-Perú. 2-36 p.
4. BELLO A. S.; JULCA O, A. 1994. "Influencia de Épocas de Plantación,
Tipos de Hijuelos e inducción Floral en el crecimiento y
Desarrollo del Cultivo de la Piña (Ananas Comosus L. Merr)
c.v. SAMBA Bajo condiciones de Chanchamayo-Perú. Serie
Informe Técnico N° ST-05. Lima-Perú. 13-23 p.
5. CALZADA, B. 1982. "Métodos Estadísticos para la investigación".
Editorial Milagros S.A. Lima –Perú. 644 p.
6. COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. y M-F. DUVAL. 1999. "Pineapple
germplasm conservation: experiences from the Martinique field
collection". En: F. Engelmann (ed.): Management of field and *in vitro*
genebanks. International Plant Genetic Resources
Institute, Italia. p. 59-62.
7. DUSTAN, D. I. 1982. "Transplantation y Post-transplantation of
Micropropagated tree-fruit rootstock. Comb Proc. Inst Plant
Proc. Soc. 1981. 31,39-44p.

8. FAO, 2004a. Importancia económica de la Piña. Publicación electrónica de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
http://www.proexant.org.ec/HT_Piña.html
9. FAO, 2004b. Manual de Cultivo de Piña. Publicación electrónica de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. <http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20piña.html>
10. FITCHET, M. 1990. "Clonal propagation of Queen and smooth Cayene pineapples" Acta Hort., 275. 261-266.
11. FUCHIGAMI, L.; T. CHENG and A. SOELDNER. 1981. Abaxial Transpiration and Water Lost in Aseptically Cultured Plum. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 (4): 519-522.
12. GEORGE, E.F., 1996. " Plant Propagation by tissue culture" part 2nd. Edition.
13. HURTADO ,D. y MERINO, M. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales). Editorial Trillas. México. 67 p.
14. INBIO 1997. (Instituto Nacional de Biodiversidad,). Publicación electrónica
<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c046/o0161.htm>
15. IPGRI. 2004. Investigación Colaborativa. Publicación electrónica del Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales. Roma, Italia. <http://www.ipgri.cgiar.org/regions/americas/programas/pineapple.htm>

16. LEAL, F.; ANTONI, M.G. 1978. Descripción y clave de las variedades de piña cultivadas en Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. Alcance. Venezuela. 29:51-79.
17. MACEDO, F.H. 1998. "Niveles de fertilización fosfopotásica para la producción de maní (*Arachis hipogaea* L.) en un suelo ácido de la zona del Bajo Mayo". Tesis. FAGRO. UNSM. 45 p.
18. MATHEWS, V.H. 1976. "Micropropagation of *Ananas sativus* *in vitro*". Z. Pflzenphysiol., 79. 450-454.
19. MEJIA, A. R. 1994. "Agrobiotecnología: Fundamentos y aplicaciones". Universidad Agraria La Molina. www.iica/ecuarural.com
20. MINAG, 2003. "Series históricas de producción de la Región San Martín" Dirección de Información Agraria.
21. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. "A revised medium for rapid growth bio-assays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant. 15, 473-497.
22. MURASHIGE, T. & TUCKER. 1969. "A medium for rapid growth bio-assays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant. 15, 473-497.
23. PETERSON, C. A. y R. A. FLETCHER 1975. "Canadian Jour". Bot. 53: 243-248.
24. PIERIK, R. L. M. 1990. Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 295 p.
25. ROCA, W; MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. 20-35 p.

26. ROJAS, T. 1991. "Métodos estadísticos para la investigación". 47 pag.
27. RUIZ, R. A. 2003. "Micropropagación y Determinación Cromosómica del Genero Croton Productoras de latex". Tesis Magíster Scientiae. UNALM. LIMA-PERÚ.
28. SEIBERT, M., "Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to – 196°C", Science, 191: 1178-1179, 1976.
29. STYER, D. J. 1988. "Meristem and shoot tip culture for propagation pathogen elimination and Germoplasm preservation". Horticultural Reviews 5:227-227p.
30. STREET, H. E., 1977. "Plant tissue and cell culture", Sec. Ed. Academic Press., U.S.A., 1-10 p.
31. SUAREZ, E. O. 1990. "Cultivo in vitro de segmentos de Chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Tesis para optar el grado Agrónomo. UNALM. Lima – Perú. 13-15 p.
32. TAKASHI, H. 1980. " *in vitro* propagation of Bromeliads en liquid cultures". Hort Science, 15(5): 603-604.
33. TIZIO. R. M. 1980. En: "Fisiología Vegetal (edit. E. M. Sivori, E. R. Montaldi y O. H. Caso. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 454-455.
34. WEE, Y.C. 1982. "Vegetative propagation, tissue culture and the Malaysian pineapple industry". Pp. 121-123 in Rao A.N. (ed.).
35. ZEE, F.T. 1992. "*In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) Germplasm". Hort Science 27(1): 57-58.

ANEXOS

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADENINA	:	Compuesto nitrogenado nuclear, se usa en forma de sulfato en medio de cultivo.
ADVENTICIO	:	Crecimiento a partir de sitios o de lugares inusuales, tal como raíces aéreas a partir de del tallo o de yema en otros lugares que no sean axilares.
APICAL	:	Punta o ápice.
ASÉPTICO	:	Libre de organismos.
ASEXUAL	:	Sin sexo vegetativo.
AUTOCLAVE	:	Recipiente que sirve para esterilizar mediante presión de vapor.
AUXINAS	:	Hormonas de crecimiento asociados con la división celular y alargamiento e iniciación radicular.
CITOCININA	:	Grupo de reguladores de crecimiento que inducen formación de yemas y multiplicación celular.
CONTAMINANTES:		Se usa en este trabajo para todo microorganismo.
CULTIVO DE TEJIDOS:		Literalmente es cultivo de tejidos, se usa ampliamente como sinónimo de cultivo in vitro.
DIFERENCIADO	:	Desarrollo de tejido u órgano con funciones específicas.
EXPLANTE	:	Parte de una planta usada para el inicio de un cultivo.
MICROPROPAGACIÓN:		Propagación extremadamente pequeña, usado indistintamente como cultivo de tejidos o cultivo in vitro, pero usado mas específicamente para denotar como multiplicación in vitro.

PROLIFERACIÓN : Multiplicación rápida.

REGULADORES DE CRECIMIENTO: Compuestos orgánicos que influyen en el crecimiento y multiplicación tal como las auxinas y citoquininas.

TRANSFERENCIA : Proceso de dividir cultivo y colocar las secciones de cultivo en recipientes con medios de cultivo frescos y estériles.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

FAO	: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
EMBRAPA	: Empresa Brasileira de Investigações Agropecuárias.
CENARGEN	: Centro Nacional de recursos Genéticos y Biotecnología.
CIRAD-FLHOR	:
IPGRI	: Instituto Internacional de Investigación en Recursos Genéticos Vegetales.
CNPMF	: Centro Nacional de Investigaciones en Yuca y Fruticultura Tropical.
FONAIAP	: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Venezuela.
M & S	: Sales Nutritivas Básicas del Medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962).
L&S.	: Medio de cultivo Linsmaier & Skoog.
1-ANA	: Ácido α -Naftalen-Acético
AIB	: Ácido Indol Butírico
6-BAP	: Bencil Amino Purina
ppm	: Partes por Millón
rpm	: Revoluciones por Minuto
mg/L	: Miligramos por litro
NaOCl	: Hipoclorito de sodio
HCl.	: Ácido Clorhídrico
pH	: Grado de acidez o alcalinidad de un medio de cultivo.
g/L	: Gramos por litro.

PRODUCCIÓN

MINISTERIO DE AGRICULTURA
DIRECCIÓN REGIONAL AGRARIA
SAN MARTÍN

SAN MARTÍN
SERIE HISTÓRICA DE PRODUCCIÓN EN (TM) DEL CULTIVO DE PIÑA
AÑOS : 1989.....2003

AÑOS	TOTAL	RIOJA	MOYOBAMBA	EL DORADO	LAMAS	SAN MARTÍN	PICOTA	BELLAVISTA	HUALLAGA	MARISCAL CÁGERES	TOCAGHE
2003	204	51	84	41	28
2002	7983	1006	..	27	3589	496	320	818	1727
2001	7325.4	745.4	0	28	3415	539	0	0	320	720	1558
2000	5081	292	0	0	2844	303	0	0	281	554	807
1999	3546.9	199	0	0	2077	136	0	0	225.90	335	574
1998	2424	96	-	-	1308	144	-	-	164	272	440
1997	3081	165	-	-	1910	140	-	-	125	386	355
1996	2994	40	-	-	558	-	-	-	108	540	1748
1995	496	-	35	-	174	-	-	-	36	251	-
1994	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1993	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1992	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1991	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1990	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1989	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE: DIA - SAN MARTÍN

La producción del año 2003 corresponde del periodo de Enero

SIEMBRA

MINISTERIO DE AGRICULTURA
DIRECCIÓN REGIONAL AGRARIA
SAN MARTÍN

SAN MARTÍN
SERIE HISTÓRICA SOBRE LAS ÁREAS SEMBRADAS (HAS) DEL CULTIVO DE PIÑA
CAMPAÑAS : 88/89 - 2001/2003

CAMPAÑA	TOTAL	RIOJA	MOYOBAMBA	EL DORADO	LAMAS	SAN MARTÍN	PICOTA	BELLAVISTA	HUALLAGA	MARISCAL CÁCERES	TOCACHE
2002/2003	90.5	53.5	-	-	37	-	-	-	-	-	-
2001/2002	67	30	-	-	27	-	-	-	-	-	10
2000/2001	58	14	0	0	23	2	0	0	0	3	16
99/2000	132	19	-	-	31	17	-	-	-	5	60
98/99	90	10	-	2	33	15	-	-	4	19	7
97/98	89	1	-	-	27	1	-	-	3	-	57
96/97	48	12	-	-	16	7	-	-	7	4	2
95/96	27	10	-	-	2	-	-	-	3	9	3
94/95	41	-	14	-	15	-	-	-	-	12	-
93/92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92/93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91/92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89/90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88/89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE: DIA - SAN MARTÍN

Campaña 2002-2003 corresponde a Agosto-Enero

FOTOGRAFÍAS

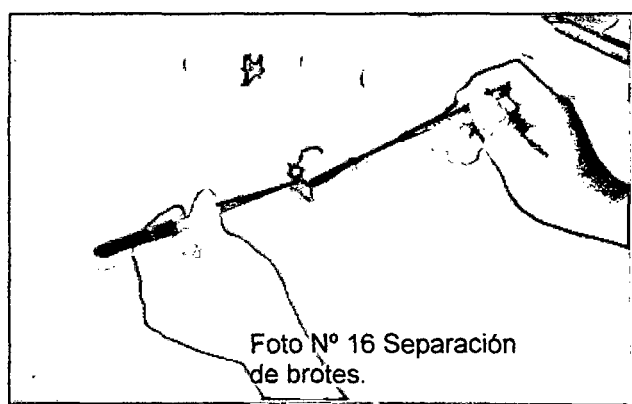
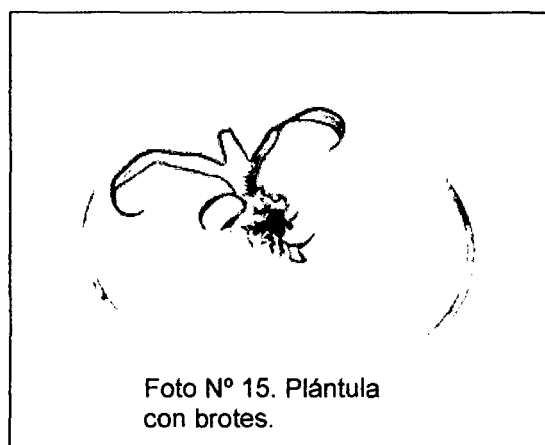


Foto N° 17. Plántula.



Foto N° 18. Plántula en
enraizamiento



Foto N° 19. Enraizamiento de
plántulas.

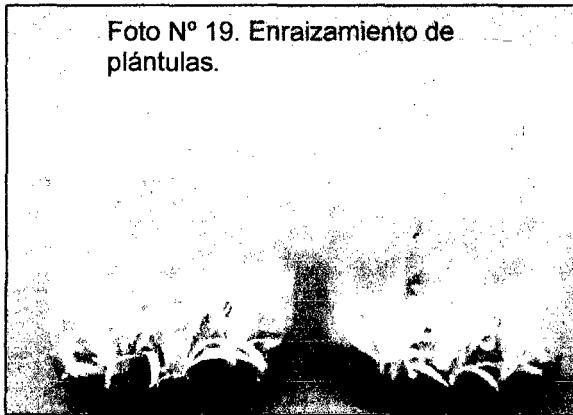


Foto N° 20. Sustrato de
aclimatación





Foto Nº 21. Trasplante de plántulas.



Foto Nº 22. Desarrollo en vivero.



Foto Nº 23. Embolsado de plántulas.

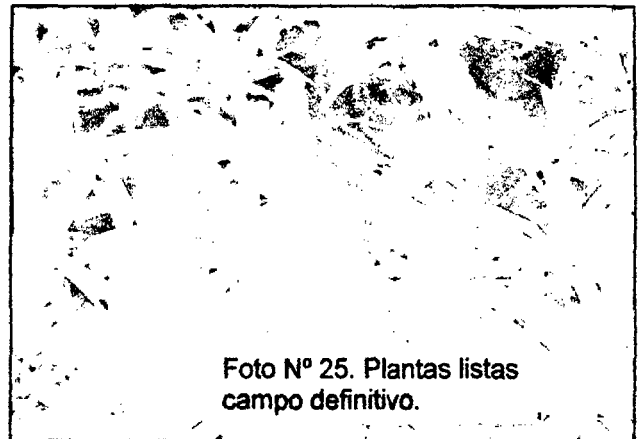


Foto N° 25. Plantas listas
campo definitivo.

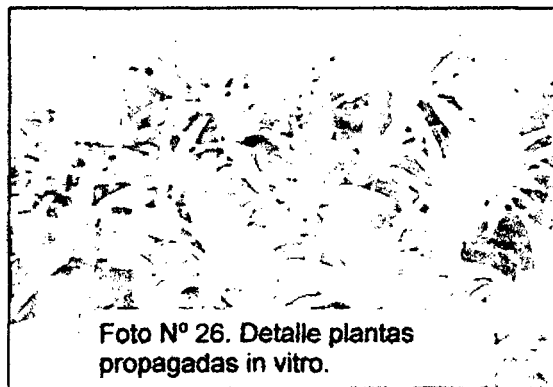


Foto N° 26. Detalle plantas
propagadas in vitro.

